

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 863 157 A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
09.09.1998 Patentblatt 1998/37

(51) Int. Cl.⁶: **C07K 16/28**, C12N 5/20,
G01N 33/577, G01N 33/574,
A61K 39/395

(21) Anmeldenummer: **97122273.2**

(22) Anmeldetag: **17.12.1997**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC
NL PT SE**
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: **05.03.1997 DE 19708877**

(71) Anmelder:
**Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Universitätsklinikum
72076 Tübingen (DE)**

(72) Erfinder:
**Bühring, Hans-Jörg, Dr.
72076 Tübingen (DE)**

(74) Vertreter:
**Otten, Hajo, Dr.-Ing. et al
Witte, Weller, Gahlert, Otten & Steil,
Patentanwälte,
Rotebühlstrasse 121
70178 Stuttgart (DE)**

(54) **Anti-Metakaryozyten monoklonaler Antikörper 97A6**

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft einen monoklonalen Antikörper, der an Megakaryozyten, nicht jedoch an Thrombozyten bindet. Die Erfindung betrifft ferner Hybridomzellen, die einen derartigen Antikörper erzeugen, sowie ein Verfahren zur Herstellung solcher Hybridomzellen.

EP 0 863 157 A1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft einen monoklonalen, gegen Megakaryozyten gerichteten Antikörper.

Derartige Antikörper sind inzwischen allgemein bekannt, sie sind gegen Megakaryozyten-spezifische Antigene gerichtet.

Megakaryozyten sind außergewöhnlich große Zellen mit einem Durchmesser von bis zu 60 µm, die sich im menschlichen Knochenmark befinden.

In einem als Hämatopoese oder Blutbildung bezeichneten Prozeß gehen Megakaryozyten, ebenso wie Lymphozyten, Monozyten und Erythrozyten, aus pluripotenten Stammzellen hervor. Megakaryozyten gehören der myeloischen Reihe der Hämatopoese an. Sie differenzieren sich aus einer für alle myeloischen Zellen gemeinsamen Vorläuferzelle, der sogenannten CFU-GEMM (colony forming unit: granulocytes, erythrocytes, monocytes, megakaryocytes). Zur Bildung der verschiedenen ausdifferenzierten Effektorzellen durchlaufen die myeloischen Stammzellen jeweils spezifische Differenzierungsprogramme.

Die Hämatopoese aller Zellen der myeloischen und lymphatischen Reihe findet im Knochenmark statt. Bis auf die Megakaryozyten wandern jedoch alle ausdifferenzierten myeloischen Zellen aus dem Knochenmark ins Blut ab.

Die im Knochenmark verbleibenden Megakaryozyten entwickeln Ausläufer, die direkt in die Blutgefäße des Knochenmarks hineinragen. Von diesen Ausläufern werden die Thrombozyten, auch Blutplättchen genannt, abgegeben und von dort aus im gesamten Blutsystem verteilt. Die Thrombozyten stellen somit die letzte Differenzierungsstufe der Megakaryozyten dar. Sie sind jedoch keine Zellen im eigentlichen Sinne, sondern lediglich Zellfragmente. Die physiologische Aufgabe der Thrombozyten ist das Starten der Blutgerinnungskaskade.

Die Unterscheidung der verschiedenen Zelltypen in Knochenmark und Blut sowie deren Zuordnung in verschiedene Differenzierungsstadien spielt im Klinikalltag eine wesentliche Rolle. So ist es bspw. zur Diagnose von Blutbildungsstörungen notwendig, die Zellzahl jedes spezifischen Zelltyps und möglichst auch das jeweilige Differenzierungsstadium zu erfassen.

Darüber hinaus ist die Untersuchung der Blut- und Blutvorläuferzellen im Knochenmark bei der Diagnose von Leukämien wichtig, Anzahl, Art und Stadium der Zellen werden zur Klassifizierung oder Zuordnung des Leukämietyps sowie zur Entscheidung über eine angemessene Therapie herangezogen. Dabei richtet sich die Zuordnung von Leukämien einerseits nach dem klinischen Verlauf der Krankheit, und andererseits nach dem Reifegrad und der Abstammung der pathologisch veränderten Leukozyten. Dazu ist es jedoch notwendig, Zelltyp und Status sowohl der gesunden als auch der entarteten, in einer Patientenprobe enthaltenen Zellen zu erfassen.

Bisher erfolgen diese Analysen entweder im Mikroskop anhand der Morphologie der Zellen, nach Anfärbung mit klassischen Färbemethoden, bspw. der Pappenheim-Färbung, und durch manuelles Auszählen. Modernere Verfahren zur Auswertung von Knochenmarksbiopsien oder Blutproben verwenden Antikörper, die spezifische Antigene als Marker für bestimmte Zelltypen und -stadien erkennen. Die Antikörper können dann in Standardverfahren wie dem ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) oder der Durchflußzytometrie (FACS-Analyse, fluorescence activated cell sorting) automatisiert nachgewiesen werden.

Die wesentlichste Voraussetzung zur Anwendung derartiger Verfahren ist es, geeignete Antikörper zur Hand zu haben, die eine hohe Sensitivität und vor allem Spezifität für die verschiedenen Zelltypen und -stadien aufweisen und die darüber hinaus in großen Mengen zur Verfügung stehen.

Ein Problem bei der Analyse von Knochenmarks- und Blutzellen stellen die Megakaryozyten und vor allem ihre "Ableger", die Thrombozyten, dar. Es sind verschiedene Antikörper bekannt, die gegen Megakaryozyten-spezifische Antigene gerichtet sind, wie eingangs bereits erwähnt wurde. Diese Antikörper erkennen jedoch alle zusätzlich auch Thrombozyten, so daß mit diesen Antikörpern eine Unterscheidung von Megakaryozyten und Thrombozyten nicht möglich ist.

Ein weiteres Problem ergibt sich dadurch, daß sich Thrombozyten auch an andere Blutzellen oder Vorläuferzellen, vor allem an Monozyten, anlagern. So werden Monozyten fälschlich als Megakaryozyten oder Thrombozyten identifiziert, und sowohl die Monozyten- als auch die Megakaryozytenanalyse liefert falsche Ergebnisse.

Vor diesem Hintergrund ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, einen Antikörper bereitzustellen, der spezifisch Megakaryozyten erkennt, nicht jedoch an Thrombozyten bindet, und der in praktisch unbegrenzter Menge zur Verfügung steht.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung eines monoklonalen, gegen Megakaryozyten gerichteten Antikörpers gelöst, der nicht mit Thrombozyten reagiert.

Ein solcher monoklonaler Antikörper wird von Hybridomzellen produziert und freigesetzt, die unter der Nr. DSM ACC2297 am 12.02.1997 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) hinterlegt sind. Er ist mit der Bezeichnung 97A6 benannt.

Mit dem erfindungsgemäßen Antikörper wurde erstmals ein monoklonaler Antikörper bereitgestellt, der standardisiert reproduzierbar ist und somit potentiell unbegrenzt hergestellt werden kann, und der ausschließlich Megakaryozyten, nicht aber Thrombozyten erkennt.

Mit dem erfindungsgemäßen Antikörper ist nunmehr eine über die bisherigen Möglichkeiten hinausgehende Analyse von Knochenmarks- und Blutproben durchführbar. Während der Untersuchungen, die zur Entwicklung des erfindungsgemäßen Antikörpers führten, wurde nämlich überraschenderweise festgestellt, daß der Antikörper 97A6 nicht mit peripheren Blutzellen, also Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, Erythrozyten und Thrombozyten reagiert, sondern selektiv eine kleine Population von Knochenmarkszellen erkennt, die die Megakaryozyten-spezifischen Marker CD41 und CD61 exprimieren.

Darüber hinaus wurde festgestellt, daß die von dem Antikörper 97A6 erkannten Zellen nicht das Stammzell-spezifische Antigen CD34 exprimieren. Dies bedeutet, daß der Antikörper weder die für alle Zellen der myeloischen Reihe spezifischen Vorläuferzellen, noch die aus reifen Megakaryozyten hervorgehenden Thrombozyten erkennt.

Der Antikörper stellt somit ein bisher einzigartiges Nachweismittel zur zell- und stadienspezifischen Identifizierung von Knochenmarks- und Blutzellen dar.

Darüber hinaus bietet der erfindungsgemäße Antikörper nun die Möglichkeit, bei der Auswertung von Knochenmarksbiopsien und Blutbildern eine eindeutige Unterscheidung von Megakaryozyten einerseits und Thrombozyten und Monozyten andererseits zu erlauben, um damit die Diagnose von Blutbildungsstörungen und Tumoren, insbesondere Leukämien, zu erleichtern.

Die Erfindung betrifft ferner Hybridomzellen, die einen monoklonalen Antikörper gegen Megakaryozyten erzeugen. Sie umfaßt insbesondere die Hybridomzellen, die unter der Nr. DSM ACC2297 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) hinterlegt sind und den Antikörper mit der Bezeichnung 97A6 produzieren.

Hybridomzellen, die einen spezifisch gegen Megakaryozyten gerichteten Antikörper synthetisieren und freisetzen, der nicht an Thrombozyten bindet, werden durch ein Verfahren hergestellt, das die im Stand der Technik grundsätzlich geläufigen Schritte umfaßt, wie sie bspw. von Bühring et al. in Hybridoma 1991, Band 10, Nr. 1, S. 77-78 beschrieben wurden:

a) Immunisierung oder Sensibilisierung eines Tieres, vorzugsweise einer Maus vom Balb/c-Stamm, mit dem Antigen bzw. Immunogen;

b) Gewinnung der antikörperproduzierenden Zellen, vorzugsweise der Milzlymphozyten dieses Tieres;

c) Fusionierung dieser antikörperproduzierenden Zellen mit einer stabilen, immortalisierten Zelllinie, vorzugsweise einer Myelomzelllinie, zu Hybridomzellen; und

d) Vereinzelung und Vermehrung (Klonierung) solcher Hybridomzellen, die einen Antikörper sezernieren, der an das Antigen bindet.

Dabei wird das Tier mit Zellen der erythro-/megakaryoblastischen Zelllinie UT-7 immunisiert.

Wenn Hybridomzellen gesucht werden, die Knochenmarkszellspezifische Antikörper produzieren, so ist es bei dem Screening der Hybridomzellen vorteilhaft, wenn solche Hybridomzellen ausgewählt werden, die Antikörper mit einer Spezifität für Knochenmarkszellen produzieren, wobei es ferner vorteilhaft ist, wenn nur solche Hybridomzellen auf die Spezifität der von ihnen produzierten Antikörper mit Knochenmarkszellen getestet werden, bei denen zuvor nachgewiesen wurde, daß diese Antikörper eine schwache oder bevorzugt eine negativ Reaktion mit peripheren Blutzellen zeigen.

Bei diesem Screening-Schema ist vorteilhaft, daß bereits im ersten Schritt solche antikörperproduzierenden Hybridomzellen ausgesondert werden, die mit peripheren Blutzellen kreuz-reagieren, und somit auf schnelle und einfache Art und Weise antikörperproduzierende Hybridomzellen selektioniert werden, die an Knochenmarkszell-spezifische Antigene binden.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung eines spezifischen gegen Megakaryozyten gerichteten Antikörpers zur Analyse der Hämatopoese.

Wie oben erwähnt, ist es mit Hilfe des erfindungsgemäßen Antikörpers nunmehr möglich, Megakaryozyten von myeloischen Stammzellen und Thrombozyten zu unterscheiden und damit einen spezifischen Weg der Hämatopoese zu untersuchen. Die Verwendung des erfindungsgemäßen Antikörpers ist nicht nur für den Forscher interessant, der die Differenzierungsprozesse der Megakaryozytenentstehung untersucht. Diese Anwendung des erfindungsgemäßen Antikörpers spielt auch im klinischen Diagnoselabor eine Rolle, wenn anhand von zellulärem Material eines an einer Blutbildungsstörung leidenden Patienten festgestellt werden muß, welcher Zelltyp bzw. welcher Schritt der Hämatopoese bei ihm gestört ist.

In einer bevorzugten Ausgestaltung wird der erfindungsgemäße Antikörper dazu verwendet, die zelluläre Zusammensetzung von Patientenproben, insbesondere von Knochenmarksbiopsien und/oder Blutproben zu analysieren. Dabei dient der erfindungsgemäße Antikörper dem Nachweis von Megakaryozyten, die auch dann spezifisch

erkannt werden, wenn ein hoher Hintergrund von Thrombozyten in der Probe enthalten ist.

Dem in vielen Kliniken und Laboratorien eingesetzten Routineverfahren zur Bestimmung der zellulären Zusammensetzung in Patientenproben mit Hilfe von ELISA- oder FACS-Geräten wird somit ein Antikörper mit bisher noch nicht erreichter Spezifität zur Verfügung gestellt.

In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung wird der erfindungsgemäße Antikörper zur Bestimmung des Differenzierungsstadiums von Megakaryozyten eingesetzt, da er keine Kreuzreaktivität mit Stammzellen oder Thrombozyten aufweist. Dies ist besonders dann von Vorteil, wenn bei Blutbildungsstörungen eine Störung in der Megakaryozytenentwicklung vorliegt. Durch Zellstadienanalyse der im Knochenmark des Patienten enthaltenen Megakaryozyten-Vorläuferzellen und Vergleich mit dem Zustand dieser Zellen bei gesunden Menschen kann festgestellt werden, welche Zellen eines definierten Stadiums dem Patienten fehlen. Daraus kann dann geschlossen werden, in welcher Phase der Megakaryozytenentstehung die Störung vorliegt und ggf. eine geeignete Therapie eingeleitet werden. Dabei ist bspw. an Transplantation von Knochenmarkszellen gesunder Spender zu denken. Wenn die den Störungen zugrundeliegenden defekten Gene einmal aufgeklärt sind, können solche Störungen auch gentherapeutisch durch Entnahme der körpereigenen Knochenmarkszellen des Patienten, in vitro-Transfektion der Zellen mit einem geeigneten Genabschnitt, Expansion der transfizierten Zellen und nachfolgender Reimplantation therapiert werden.

In einer bevorzugten Ausführung wird der Antikörper zur diagnostischen Einordnung von Tumoren, insbesondere von Leukämien, verwendet.

Die Diagnose und Klassifizierung von Leukämien erfolgt anhand von Knochenmarksbiopsien oder Blutproben. So wird bspw. bei einer Ausprägungsform der Leukämie, der chronisch-myeloischen Leukämie (Abkürzung CML) anhand von Knochenmarksuntersuchungen der Status aller myeloischen Zellen, also der Granulozyten, Monozyten, Erythrozyten und Megakaryozyten analysiert. Der erfindungsgemäße Antikörper hat den Vorteil, hier die eindeutige Identifizierung der Megakaryozyten zu erlauben.

Um die diagnostische Applikation des erfindungsgemäßen Antikörpers zu erleichtern, kann der Antikörper mit entsprechend geeigneten Hilfssubstanzen in einer pharmazeutischen Zubereitung vermischt sein. Die Erfindung betrifft deshalb auch ein pharmazeutisches Mittel zur diagnostischen Verwendung, das einen erfindungsgemäßen, Megakaryozyten-spezifischen Antikörper enthält. Vorzugsweise enthält dieses pharmazeutische Mittel einen Antikörper, wie er von den unter der Nr. DSM ACC2297 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DMSZ, hinterlegten Hybridomzellen produziert und freigesetzt wird.

In einer besonders bevorzugten Ausführung des pharmazeutischen Mittels ist der erfindungsgemäße Antikörper mit einem Marker, insbesondere mit einem Fluoreszenzmarker, verbunden.

Hierbei ist vorteilhaft, daß der Antikörper dann mit hoher Sensitivität nachgewiesen werden kann, weshalb nur kleine Mengen des pharmazeutischen Mittels zur Diagnose eingesetzt werden müssen. Außerdem ist bei Verwendung eines solchen pharmazeutischen Mittels die Diagnose mit Hilfe von automatisierten ELISA-Geräten und Durchflußzytometern möglich.

Darüber hinaus betrifft die Erfindung auch ein Verfahren zur Analyse der zellulären Zusammensetzung einer Patientenprobe, mit den Schritten:

a) Inkubation der Patientenprobe mit einem pharmazeutischen Mittel, in dem ein mit einem Marker verbundener, erfindungsgemäßer Antikörper enthalten ist; und

b) Nachweis des Markers, vorzugsweise durch ELISA- oder FACS-Analyse.

Dieses Verfahren hat den Vorteil, daß damit die Bestimmung von Zellen in Patientenproben hochspezifisch, sensitiv und schnell erfolgt und in automatisierter Form durchführbar ist.

Weitere Vorteile ergeben sich aus der nachstehenden Beschreibung.

Es versteht sich, daß die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in der jeweils angegebenen Kombination, sondern auch in anderen Kombinationen oder in Alleinstellung verwendbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

Die Erfindung wird im folgenden anhand von Anwendungs- und Ausführungsbeispielen unter Heranziehung der Figuren näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 ein Diagramm, in dem die Bindung des Antikörpers 97A6 an in vitro kultivierte und differenzierte CD34⁺-Knochenmarkszellen bei einer Kultivierungsdauer von 0, 3, 7 und 12 Tagen dargestellt ist;

Fig. 2 sieben Histogramme aus durchflußzytometrischen Untersuchungen über die Expression von sieben verschiedenen Zelloberflächenstrukturen der Zelllinie UT-7; und

Fig. 3 Histogramme der durchflußzytometrischen Untersuchungen der gleichen sieben Oberflächenstrukturen wie

in Fig. 2, die jedoch mit einer Sublinie von UT-7 mit hoher Expression des 97A6 Antigens erhalten wurden.

Beispiel 1: Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Megakaryozyten-spezifischer Antikörper

Als Antigen werden Zellen der erythro-/megakaryoblastischen Zelllinie UT-7 verwendet (Komatsu N. et al. Establishment of a human leukemic cell line with megakaryocytic features: Dependency on granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, or erythropoietin for growth and survival, Cancer Res. 1991; 51: 341-348).

Acht Wochen alte Balb/c-Mäuse werden zweimal in Intervallen von zehn Tagen intraperitoneal mit 10^7 Zellen der Zelllinie UT-7 infundiert. Vier Tage vor der Fusion werden 5×10^5 Zellen direkt in die Milz appliziert, um die Immunantwort zu verstärken.

Die Antikörper-Bildung im Mausorganismus wird dadurch überprüft, daß das Blutserum des betreffenden Tieres in dem dem Fachmann geläufigen ELISA-Test auf Bindungseigenschaften mit dem Antigen untersucht wird.

Nach ca. drei Wochen werden die Lymphozyten des erfolgreich immunisierten Tieres gewonnen, indem die Milz herausoperiert und zu einer Zellsuspension zerkleinert wird.

Die suspendierten Milzzellen werden in Anwesenheit von Polyethylenglykol mit Myelomzellen des bekannten Stammes SP2/0 fusioniert. Die Fusionskultur wird in Hypoxanthin-, Aminopterin- und Thymidin-(HAT)-haltigem Medium, hier in HAT-RPMI-1640, kultiviert, in dem sich nur hybride Zellen vermehren können, da diese sowohl die Eigenschaften der Myelomzellen zur unbegrenzten Teilungsfähigkeit als auch die Eigenschaft der antikörperproduzierenden Lymphozyten zum Wachstum in HAT-haltigem Medium haben.

Nach der Fusion werden die Zellen in Mikrotiterplatten ausplattiert und bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Die Kulturüberstände werden nach 10 bis 14 Tagen auf der Zelllinie UT-7 im Durchflußzytometer gescreent. In einem zweiten Schritt werden die Überstände auf Reaktivität mit peripheren Blutzellen getestet, um solche Hybridomzellen auszusondern, die Antikörper produzieren, die keine selektiven Knochenmarkszellantigene exprimieren. Überstände, die eine negative oder schwache Reaktion mit peripheren Blutzellen zeigen, werden anschließend auf Reaktivität mit Knochenmarkszellen getestet. Hybridome, die Antikörper mit Spezifität für Knochenmarkszellen produzieren, werden ausgewählt und nach dem bekannten Grenzverdünnungsverfahren vereinzelt und kultiviert, d.h. kloniert.

Bei dieser Screening-Strategie wird Nutzen aus der Tatsache gezogen, daß Megakaryozyten ausschließlich im Knochenmark, nicht jedoch im Blut vorkommen.

Positiv reagierende Hybridomzellkulturen werden weiter kultiviert, die Antikörper angereichert, gereinigt und charakterisiert.

Nach der obigen Screening-Strategie wurde der monoklonale Antikörper 97A6 erhalten. Der Isotyp wurde über PE-konjugierte Anti-Isotyp-spezifische Antiseren durch direkte Immunfluoreszenz zu IgG1 bestimmt.

Die Produktion, Reinigung und Charakterisierung der Antikörper erfolgte mit den in Fachkreisen allgemein bekannten Methoden. Der Antikörper 97A6, der von den unter der Nr. DSM ACC2297 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ, hinterlegten Hybridomzellen erzeugt wird, weist die folgenden charakteristischen Merkmale auf:

Immunglobulinklasse: IgG1

spezifische Bindungsaffinität an: Megakaryozyten, keine Kreuzreaktion mit Thrombozyten

Beispiel 2: Screening von etablierten Zelllinien und primären Zellen auf Erkennung durch den Antikörper 97A6

Um die Spezifität des Antikörpers 97A6 zu untersuchen, wurden insgesamt 48 verschiedene etablierte Zelllinien auf ihre Reaktivität mit dem Antikörper 97A6 hin analysiert. Die Ergebnisse sind unten in Tabelle 1 aufgelistet.

Die Abstammung sowie die entscheidenden Eigenschaften jeder einzelnen Zelllinie waren bekannt, so daß dieses Experiment nicht nur die Spezifität des Antikörpers beleuchtet, sondern auch Aufschluß über die Expression des bisher noch nicht charakterisierten 97A6-Antigens gibt.

Darüber hinaus wurde die Erkennung primärer Blutzellen durch den Antikörper 97A6 getestet, nämlich aller der myeloischen Reihe angehörenden reifen Blutzellen. Die Ergebnisse sind unten in Tabelle 2 aufgelistet.

Die Reaktion der Zellen mit dem Antikörper 97A6 wurde im Durchflußzytometer (FACS-Gerät) gemessen.

In Tabelle 1 ist die Reaktion des Antikörpers 97A6 mit Zelllinien, in Tabelle 2 die Reaktion mit primären Zellen aufgeführt.

Tabelle 1: Reaktion des Antikörpers 97A6 mit verschiedenen Zelllinien

| Zelllinie | Art der Zelllinie | Eigenschaft der Zelllinie | Erkennung durch 97A6 |
|-----------|-------------------|-------------------------------|----------------------|
| DU.4475 | Tumorzelllinie | Brustkarzinom (epithelial) | - |
| T-47D | Tumorzelllinie | Brustkarzinom | - |
| MCF-7 | Tumorzelllinie | Brustkarzinom | - |
| NCI-H128 | Tumorzelllinie | SCLC (Small Cell Lungenkrebs) | - |
| NCI-H69 | Tumorzelllinie | SCLC (Small Cell Lungenkrebs) | - |
| SK-MES | Tumorzelllinie | Lungenkarzinom (squamous) | - |
| Calu 1 | Tumorzelllinie | Lungenkarzinom (epidermoid) | - |
| Calu 3 | Tumorzelllinie | Lungenkarzinom (adeno) | - |
| Calu 6 | Tumorzelllinie | Lungenkarzinom (adeno) | - |
| SK-LU1 | Tumorzelllinie | Lungenkarzinom (adeno) | - |

| Zelllinie | Art der Zelllinie | Eigenschaft der Zelllinie | Erkennung durch 97A6 |
|-----------|--|--|----------------------|
| HELA | Tumorzelllinie | Cervixkarzinom (epithelial) | - |
| 5637 | Tumorzelllinie | Blasenkarzinom (epithelial-ähnlich) | - |
| IMR-32 | Tumorzelllinie | Neuroblastom (Fibroblasten- und Neuroblasten-ähnlich) | - |
| TE-671 | Tumorzelllinie | Medulloblastom (epithelial-ähnlich) | - |
| A172 | Tumorzelllinie | Glioblastom | - |
| U138 | Tumorzelllinie | Glioblastom | - |
| U373 | Tumorzelllinie | Glioblastom | - |
| A431 | Tumorzelllinie | Epidermales Karzinom | - |
| MKPL1 | leukämische Zelllinie: erythroblastisch/megakaryozytisch | megakaryoblastische Leukämie | + |
| KU.812 | leukämische Zelllinie: erythroblastisch/megakaryozytisch | megakaryozytische/basophile Leukämie, Ph ⁺ (CML) ** | + |
| UT-7 | leukämische Zelllinie: erythroblastisch/megakaryozytisch | erythro-/megakaryozytische Leukämie | + |
| TF-1 | leukämische Zelllinie: erythroblastisch/megakaryozytisch | erythro-/megakaryozytische Leukämie | - |

| Zelllinie | Art der Zelllinie | Eigenschaft der Zelllinie | Erkennung durch 97A6 |
|-----------|--|--|----------------------|
| M07e | leukämische Zelllinie: erythroblastisch/megakaryozytisch | erythro-/megakaryozytische Leukämie | - |
| MEG-01 | leukämische Zelllinie: erythroblastisch/megakaryozytisch | erythro-/megakaryozytische Leukämie, Ph+ ⁺ (CML) ** | + |
| MOLM-1 | leukämische Zelllinie: erythroblastisch/megakaryozytisch | erythro-/megakaryozytische Leukämie, Ph+ ⁺ (CML) ** | - |
| K562 | leukämische Zelllinie: erythroblastisch/megakaryozytisch | erythro-/megakaryozytische Leukämie, Ph+ ⁺ (CML) ** | - |
| HEL | leukämische Zelllinie: erythroblastisch/megakaryozytisch | erythro-/megakaryozytische Leukämie, Ph+ ⁺ (CML) ** | - |
| EM2 | leukämische Zelllinie: myeloblastisch | myeloblastisch, Ph+ ⁺ (CML) ** | - |
| KG-1 | leukämische Zelllinie: myeloblastisch | myeloblastische Leukämie | - |
| KG-1a | leukämische Zelllinie: myeloblastisch | unreife Sublinie von KG-1 | - |

| Zelllinie | Art der Zelllinie | Eigenschaft der Zelllinie | Erkennung durch 97A6 |
|-----------|--|--|----------------------|
| HL60 | leukämische Zelllinie: myeloblastisch | myeloblastische Leukämie | - |
| DU.528 | leukämische Zelllinie: myeloblastisch | myeloblastische Leukämie | - |
| U937 | leukämische Zelllinie: myeloblastisch | myeloblastische Leukämie | - |
| OCI/AML-4 | leukämische Zelllinie: myeloblastisch | myeloblastische Leukämie | - |
| CML-T1 | leukämische Zelllinie: T-lymphoblastisch | T-lymphoblastische, Ph ⁺ (CML) ** | - |
| HSB-2 | leukämische Zelllinie: T-lymphoblastisch | T-lymphoblastische Leukämie | - |
| CCRF-CEM | leukämische Zelllinie: T-lymphoblastisch | T-lymphoblastische Leukämie | - |
| Molt-4 | leukämische Zelllinie: T-lymphoblastisch | T-lymphoblastische Leukämie | - |
| Jurkat | leukämische Zelllinie: T-lymphoblastisch | T-lymphoblastische Leukämie | - |
| Daudi | leukämische Zelllinie: B-lymphoblastisch | EBV-transformierte B-Zelllinie | - |

| Zelllinie | Art der Zelllinie | Eigenschaft der Zelllinie | Erkennung durch 97A6 |
|-----------|--|---|----------------------|
| Reh | leukämische Zelllinie: B-lympho- blastisch | pre-B-lympho- blastische Leukämie | - |
| 207 | leukämische Zelllinie: B-lympho- blastisch | pre-B-lympho- blastische Leukämie | - |
| 380 | leukämische Zelllinie: B-lympho- blastisch | pre-B-lympho- blastische Leukämie | - |
| 697 | leukämische Zelllinie: B-lympho- blastisch | pre-B-lympho- blastische Leukämie | - |
| Km3 | leukämische Zelllinie: B-lympho- blastisch | pre-B-lympho- blastische Leukämie | - |
| BV-173 | leukämische Zelllinie: B-lympho- blastisch | pro-B-lympho- blastisch, Ph ⁺ (CML) ^{**} , (CD10+) | - |
| Nalm-1 | leukämische Zelllinie: B-lympho- blastisch | pre-B-lympho- blastisch, Ph ⁺ (CML) ^{**} , (CD10+) | - |
| U266 | leukämische Zelllinie: B-lympho- blastisch | Myelomzelllinie | - |

* Ph⁺ bedeutet Philadelphia Chromosom-positiv

** CML bedeutet chronisch-myeloische Leukämie

Tabelle 2

| Reaktion des Antikörpers 97A6 mit verschiedenen primären Zellen | | |
|---|--|-------------------|
| Herkunft der Zellen | Zelltyp | Reaktion mit 97A6 |
| periphere Blutzellen von gesunden Donoren | Lymphozyten | - |
| periphere Blutzellen von gesunden Donoren | Granulozyten | - |
| periphere Blutzellen von gesunden Donoren | Monozyten | - |
| periphere Blutzellen von gesunden Donoren | Erythrozyten | - |
| periphere Blutzellen von gesunden Donoren | Blutplättchen | - |
| Knochenmarkszellen von gesunden Donoren | 0,3 bis 0,6 % der CD41 ⁺ , CD61 ⁺ mononukleären Knochenmarkszellen | + |

Die Ergebnisse dieser intensiven Untersuchungen zeigen, daß der Antikörper 97A6 hochspezifisch mit nur vier Zelllinien mit megakaryozytischen Eigenschaften reagiert, nämlich den Linien UT-7, K0.812, MKPL1 und MEG-01. Keine weiteren Zelllinien, auch keine mit leukämischen Eigenschaften wurden von dem erfindungsgemäßen Antikörper erkannt (Tabelle 1).

Die Untersuchung der Primärzellen (Tabelle 2) ergab, daß keine peripheren Blutzellen von dem erfindungsgemäßen Antikörper detektiert wurden. Unter den Knochenmarkszellen zeigte sich nur bei einer kleinen Population von 0,3 bis 0,6 %, die Thrombozyten- bzw. Megakaryozyten-spezifische Marker CD41 und CD61 enthielten, eine positive Reaktion mit 97A6.

Dies zeigt insgesamt, daß der Antikörper ein Megakaryozytenspezifischer Antikörper ist, der nicht mit Thrombozyten kreuzreagiert.

Beispiel 3: Analyse der Bindung verschiedener monoklonaler Antikörper an megakaryozytische Zelllinien

Insgesamt 14 verschiedene monoklonale Antikörper wurden mit Hilfe der Durchflußzytometrie auf ihre Reaktivität mit verschiedenen megakaryozytischen Zelllinien hin analysiert. Einer der getesteten Antikörper war der Antikörper 97A6, in dieser Studie P50 genannt. Dieser Antikörper wurde von dem Erfinder zur Verfügung gestellt.

Die eingesetzten etablierten Zelllinien repräsentieren nach derzeitigem Wissensstand verschiedene Differenzierungsstadien der Megakaryozytenentstehung von undifferenzierten Stammzellen (CD34⁺-Zellen, Zelllinie KG1a) bis hin zu den Thrombozyten. Diese Untersuchungen sind der Veröffentlichung von Sonja van den Oudenrijn et al.: Reactivity of the blind monoclonal antibody panel of the platelet section with megakaryocytic cell lines and cultured CD34⁺ cells In: Leukocyte Typing VI, Kishimoto T. et al., eds. Garland Publishing, Inc. New York (1997), in press, entnommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3

| Reaktion verschiedener Antikörper mit megakaryozytischen Zelllinien | | | | | | | |
|---|----------------------|------|-----|------|------|------|--------------|
| eingesetzte Antikörper | getestete Zelllinien | | | | | | |
| | KG1a | K562 | HEL | CHRF | MKPL | MEGO | Thrombozyten |
| CD41 (6C9) | 32 | - | 16 | 74 | 90 | 51 | 99 |
| CD42b (MB45) | - | 13 | - | 10 | 11 | - | 98 |
| CD63 (435) | 98 | 94 | 78 | 36 | 94 | 79 | 14 |
| P48(11B2.G4) | 100 | 94 | 93 | 94 | 96 | 85 | 95 |
| P49(14A2.H1) | 96 | 80 | 30 | 25 | 81 | 53 | 86 |
| P50(97A6) | - | - | - | - | 81 | 66 | - |
| P51(Ad2/13H12) | 12 | - | - | - | - | 22 | 19 |
| P52(ALMA.7) | - | - | - | - | - | - | 91 |

Tabelle 3 (fortgesetzt)

| Reaktion verschiedener Antikörper mit megakaryozytischen Zelllinien | | | | | | | |
|---|----------------------|------|-----|------|------|------|--------------|
| eingesetzte Antikörper | getestete Zelllinien | | | | | | |
| | KG1a | K562 | HEL | CHRF | MKPL | MEGO | Thrombozyten |
| P53(HIP10) | 35 | 42 | 39 | 76 | 78 | 56 | 94 |
| P54(HIP11) | 27 | - | 15 | 68 | 74 | 50 | 97 |
| P55(NaM12-6B6) | - | - | - | - | - | - | 94 |
| P56(NaM28-8C12) | - | - | 18 | - | 87 | 16 | 94 |
| P57(NaM81-1D10) | - | - | - | - | - | - | 23 |
| P58(UM.8D2) | 98 | 88 | 96 | 99 | 87 | 63 | 62 |

Die Reaktivität der Antikörper wird als Prozentsatz an positiven Zellen angegeben, wobei ein Minuszeichen eine nicht signifikante Bindung von weniger als 10 % repräsentiert.

Diese Studie zeigt, daß der Antikörper 97A6, in Tabelle 3 P50 genannt, der einzige Antikörper ist, der mit megakaryozytischen Zelllinien, nicht jedoch mit Thrombozyten reagiert. Er stellt damit ein einzigartiges Nachweismittel dar, mit Hilfe dessen Megakaryozyten von Blutplättchen unterschieden werden können.

Beispiel 4: Untersuchung des von 97A6 erkannten Differenzierungsstadiums von in vitro-expandierten megakaryozytischen Zellen

Um zu analysieren, welches bestimmte Differenzierungsstadium der Megakaryozytenentwicklung von dem monoklonalen Antikörper 97A6 erkannt wird, wurden CD34-positive Zellen aus Knochenmark mit Hilfe des MACS CD34⁺-Isolationskits entsprechend dem Herstellerprotokoll gereinigt (Milteny Biotech, Bergisch Gladbach).

Die aus Knochenmark gereinigten CD34⁺-Zellen wurden mit 930 µg/ml TPO, 10 ng/ml SCF, 10 ng/ml IL-3, 10 ng/ml IL-6 und 10 ng/ml IL-11 in Suspensionskultur inkubiert. Dieser Wachstumsfaktor/Interleukin-Mix erlaubt die in vitro-Differenzierung der pluripotenten CD34⁺-Stammzellen in Megakaryozyten.

Die Zellen wurden für 0, 3, 7 und 12 Tage kultiviert und jeweils mit dem Antikörper 97A6 durchflußzytometrisch analysiert. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Fig. 1 gezeigt. Es stellte sich heraus, daß erst am Tag 7 nach Inkulturnahme und Induktion der Megakaryozytendifferenzierung eine Bindung an den Antikörper 97A6 zu verzeichnen war. Nach 12 Tagen war die Bindung des Antikörpers erniedrigt. Wie bereits in Beispiel 3 gezeigt, wird das 97A6-spezifische Antigen auf Thrombozyten, also der letzten Stufe der megakaryozytischen Differenzierung, nicht exprimiert. Mit dem von dem Antikörper 97A6 erkannten Antigen wurde somit ein Markerprotein für ein Stadium der Megakaryozytenentwicklung identifiziert, das zwischen dem Stadium der unreifen Stammzellen und dem der Thrombozyten liegt.

Dieses definierte Stadium der Megakaryozytenentwicklung kann mit Hilfe des Antikörpers 97A6 nachgewiesen werden.

Beispiel 5: Herstellung einer Sublinie von UT-7 mit hoher Expression des 97A6-Antigens

Weder Struktur noch Funktion des 97A6-spezifischen Antigens sind bisher bekannt.

Da bei der Herstellung der Hybridomzelllinie, die den monoklonalen Antikörper 97A6 herstellt, ganze Zellen der Zelllinie UT-7 zur Immunisierung verwendet wurden, ist das entsprechende Antigen offenbar ein membranständiges Zelloberflächenprotein dieser Zelllinie.

Das Antigen wird außerdem auf drei weiteren Zelllinien exprimiert, darunter die Zelllinie MKPL1 (siehe Beispiel 1). Durch Immunpräzipitation von ¹²⁵Jod-markierten MKPL1-Zellen mit Hilfe des Antikörpers 97A6 konnte gezeigt werden, daß das von diesem Antikörper erkannte Antigen Ausprägungsformen mit Molekulargewichten von 215 und 140 kD sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen aufweist (van den Oudenrijn, S. et al.: Reactivity of the blind monoclonal antibody panel of the platelet section with megakaryocytic cell lines and cultured CD34⁺ cells. In: Leukocyte Typing VI, Kishimoto T. et al., eds, Garland Publishing, Inc. New York (1997), in press). Über diese grobe biochemische Charakterisierung hinausgehende Erkenntnisse zur Natur dieses Antigens sind nicht bekannt. Eine Ursache dafür ist darin zu sehen, daß die Zelllinie UT-7 sowie die übrigen Zelllinien, die von dem Antikörper 97A6 erkannt wurden, das entsprechende Antigen nicht stark genug exprimieren, um daraus das Protein bzw. das entsprechende Gen zu isolieren. Es wurde daher eine stärker exprimierende Zelllinie hergestellt, aus der eine Expressionsbibliothek erstellt werden kann, um daraus dann das entsprechende Gen zu identifizieren.

Dazu wurden UT-7-Zellen mit dem Antikörper 97A6 und einem fluoreszenzmarkierten zweiten Antikörper inkubiert und danach 5 % der Zellen mit der höchsten Antigendichte mit Hilfe eines FACS-Vantage-Zellsortierers herausselektiert.

Die Zellen wurden dann in Kultur vermehrt. Nach Erhalt von 10^7 Zellen wurde die Prozedur wiederholt. Die daraus hervorgegangene Zelllinie wurde UT-7/97A6 genannt. Die Ergebnisse der Analyse der Zelllinien UT-7 und UT-7/97A6 im Durchflußzytometer ist in den Fig. 2 und 3 gezeigt. Darin ist das Ausmaß der Expression des 97A6-spezifischen Antigens sowie die Expression von sechs weiteren Antigenen in der Ausgangszelllinie UT-7 (Fig. 2) sowie in der ausselektierten Zelllinie UT-7/97A6 (Fig. 3) gezeigt. Die sich aus den Histogrammen dieser FACS-Analysen ergebenden Fluoreszenzintensitäten, die die Expressionsraten der Antigene widerspiegeln, sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4

| Expression verschiedener Antigene auf UT-7 und UT-7/97A6 | | | |
|--|---------------------------|---|--|
| Analysiertes Antigen | Art des Markers | mittlere Fluoreszenzintensität auf UT-7 | mittlere Fluoreszenzintensität auf UT-7/97A6 |
| 97A6-spezifisches Antigen | megakaryozytischer Marker | 26,44 | 67,14 |
| CD117 | Stammzellmarker | 128,9 | 77,02 |
| CD109 | Stammzellmarker | 29,3 | 9,36 |
| CD13 | myeloischer Marker | 144,61 | 291,73 |
| CD33 | myeloischer Marker | 42,28 | 103,35 |
| CD41 | megakaryozytischer Marker | 70,61 | 100,54 |
| CD61 | megakaryozytischer Marker | 25,8 | 33,9 |

Diese Ergebnisse zeigen, daß die mit Hilfe des Antikörpers 97A6 isolierte Sublinie der Zelllinie UT-7 das 97A6-Antigen mit einer ungefähr dreimal so hohen Dichte wie die Ursprungszelllinie exprimiert. Die erzeugte Zelllinie UT-7/97A6 weist außerdem Eigenschaften auf, die für eine in der Differenzierung fortgeschrittene megakaryozytische Zelle typisch sind. Die Stammzellmarker CD117 und CD109 sind in der Subzelllinie wesentlich geringer exprimiert als in der Ursprungszelllinie, während die myeloischen Marker CD13 und CD33 sowie die megakaryozytischen Marker CD41 und CD61 stärker auf der erzeugten Sublinie exprimiert sind. Daraus ergibt sich, daß UT-7/97A6 eine reifere Zelllinie als die Ursprungszelllinie darstellt.

Diese Zelllinie dient nun als Ausgangsmaterial zur Herstellung einer Eryressionsbibliothek, aus der die codierenden Sequenzen des Antigens isoliert werden können.

Die Nukleinsäure- bzw. Aminosäuresequenz gibt dann Aufschluß über die Natur und möglicherweise auch die Funktion des 97A6-Antigens.

Patentansprüche

1. Monoklonaler, gegen Megakaryozyten gerichteter Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß er keine Thrombozyten erkennt.
2. Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er von Hybridomzellen produziert und freigesetzt wird, die am 12.02.1997 unter der Nr. DSM ACC2297 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ, gemäß dem Budapester Vertrag hinterlegt worden sind.
3. Hybridomzellen, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Fähigkeit aufweisen, einen Antikörper gemäß Anspruch 1 oder 2 zu erzeugen.
4. Hybridomzellen nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie am 12.02.1997 unter der Nr. DSM ACC2297 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ, gemäß dem Budapester Vertrag hinterlegt sind.
5. Verwendung eines Antikörpers nach Anspruch 1 oder 2 zur Analyse der Hämatopoese.

EP 0 863 157 A1

6. Verwendung eines Antikörpers nach Anspruch 1 oder 2 zur Analyse der zellulären Zusammensetzung von Patientenproben, insbesondere von Knochenmarksbiopsien und/oder Blutproben.
7. Verwendung eines Antikörpers nach Anspruch 1 oder 2 zum Nachweis von Megakaryozyten, insbesondere vor
einem hohen Hintergrund von Thrombozyten.
8. Verwendung eines Antikörpers nach Anspruch 1 oder 2 zur Bestimmung des Differenzierungsstadiums von
Megakaryozyten.
9. Verwendung eines Antikörpers nach Anspruch 1 oder 2 zur diagnostischen Einordnung von Tumoren, insbesond-
ere von Leukämien.
10. Pharmazeutisches Mittel zur Verwendung nach einem der Ansprüche 5 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß es
einen Antikörper gemäß Anspruch 1 oder 2 enthält.
11. Pharmazeutisches Mittel nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper mit einem Marker, ins-
besondere mit einem Fluoreszenzmarker, verbunden ist.
12. Verfahren zur Analyse der zellulären Zusammensetzung von Patientenproben, gekennzeichnet durch die Schritte
a) Inkubation der Proben mit einem pharmazeutischen Mittel nach Anspruch 11 und
b) Nachweis des Markers durch ELISA- oder FACS-Analyse.

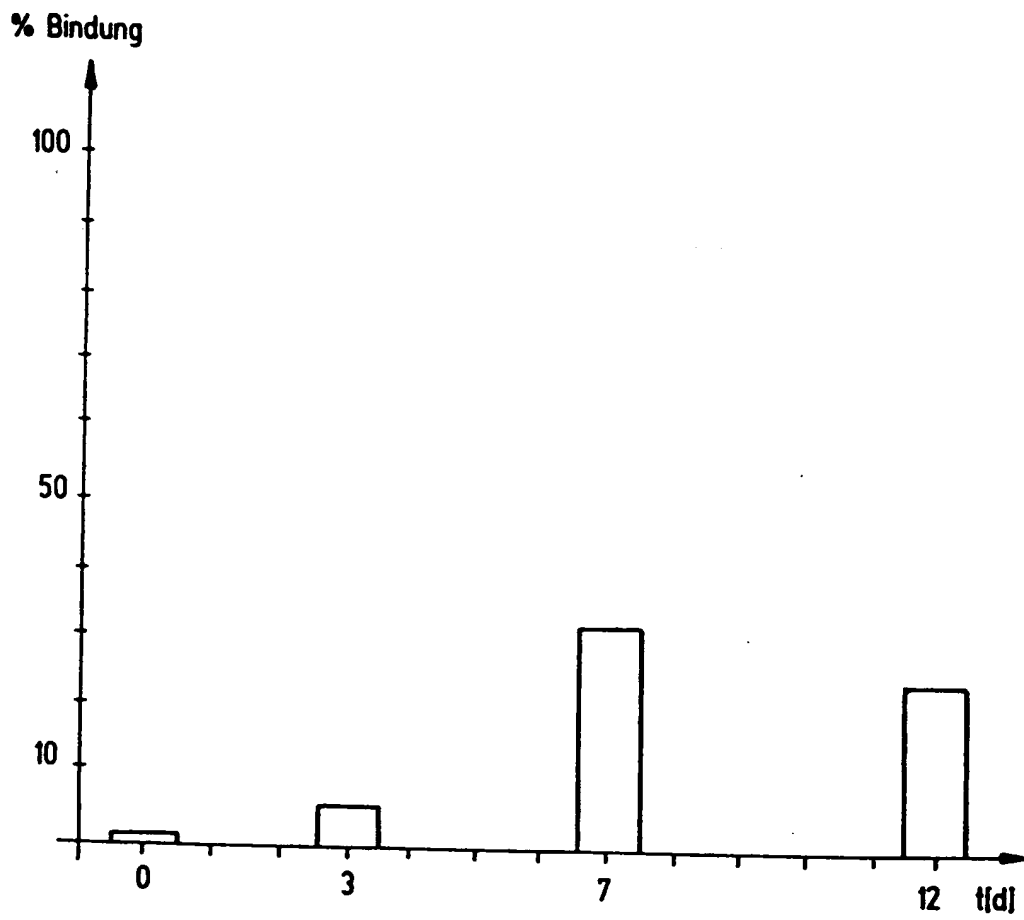
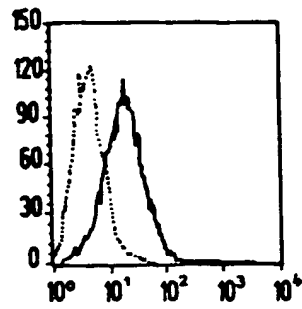
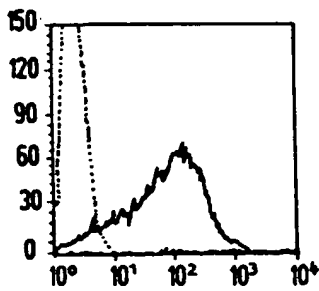


Fig.1

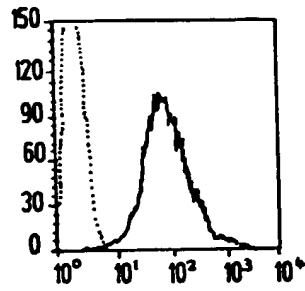
UT-7



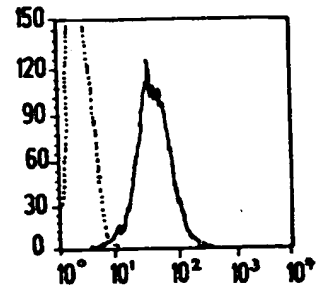
97A6



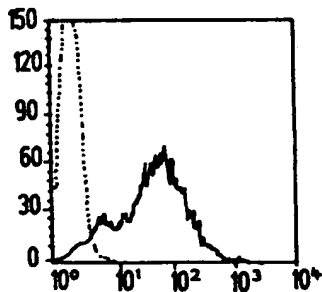
CD117



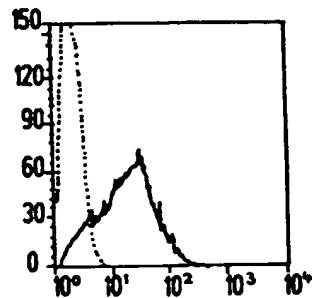
CD13



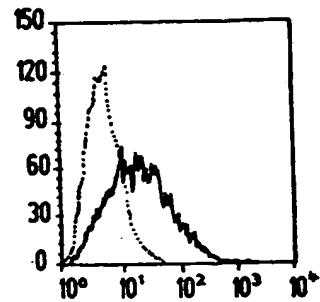
CD33



CD41



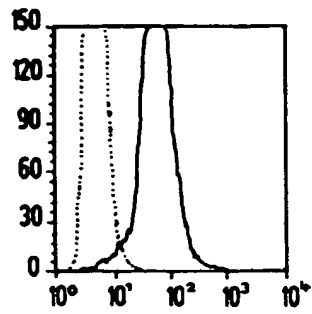
CD61



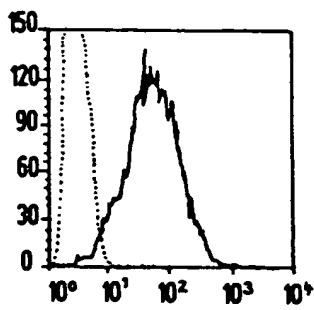
CD109

Fig. 2

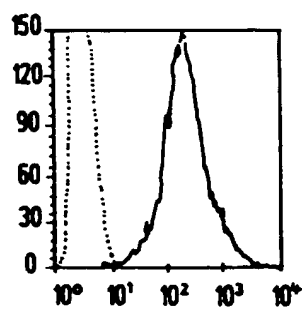
UT-7/97A6



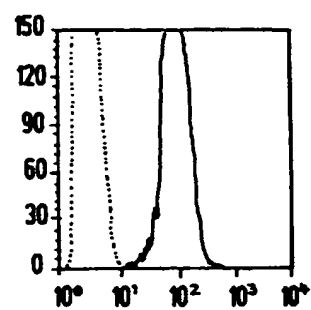
97A6



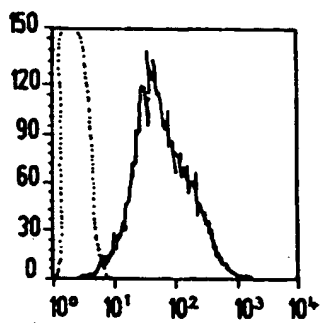
CD117



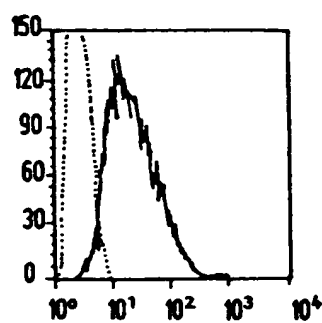
CD13



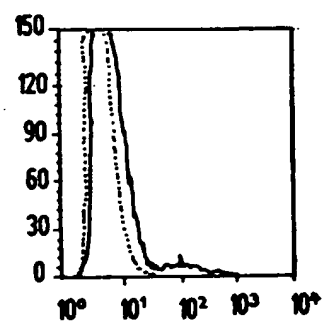
CD33



CD41



CD61



CD109

Fig. 3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT

der nach Regel 45 des Europäischen Patent-
übereinkommens für das weitere Verfahren als
europäischer Recherchenbericht gilt

Nummer der Anmeldung

EP 97 12 2273

| EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE | | | |
|--|---|-----------------------------|---|
| Kategorie | Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile | Betrifft Anspruch | KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6) |
| O,X | VAN DEN OUDENRIJN S. ET AL.: "Reactivity of the blind monoclonal antibody panel of the platelet section with megakaryocytic cell lines and cultured CD34+ cells" TISSUE ANTIGENS - 6TH INTERNATIONAL WORKSHOP AND CONFERENCE ON HUMAN LEUKOCYTE DIFFERENTIATION ANTIGENS, Bd. 48, Nr. 4-2, 10. - 14. November 1996, KOBE, JAPAN , Seite 470 XP002065240 * ZUSAMMENFASSUNG PL-5-03 * | 1-12 | C07K16/28 C12N5/20 G01N33/577 G01N33/574 A61K39/395 |
| A | WINDERBANK K. ET AL.: "Acute megakaryocytic leukemia (M7) in children" MAYO CLINICAL PROCEEDINGS, Bd. 64, Nr. 11, 1989, Seiten 1339-1351, XP002065241 * Seite 1347, Absatz 2 * | 1-6,8,9, 12 | |
| | | | RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6) |
| | | | C07K C12P C12N A61K G01N |
| UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE | | | |
| <p>Die Recherchenabteilung ist der Auffassung, daß die vorliegende Anmeldung, bzw. einige oder alle Ansprüche, den Vorschriften des EPÜ in einem solchen Umfang nicht entsprechen, daß sinnvolle Ermittlungen über den Stand der Technik für folgende Ansprüche nicht, bzw. nur teilweise, möglich sind:</p> <p>Vollständig recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Unvollständig recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Nicht recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Grund für die Beschränkung der Recherche:</p> <p>Siehe Ergänzungsblatt C</p> | | | |
| Recherchenort | | Abschlußdatum der Recherche | |
| DEN HAAG | | 18. Mai 1998 | |
| | | Prüfer | |
| | | Covone, M | |
| KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN | | | |
| <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur</p> <p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument</p> <p>& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p> | | | |

EPO FORM 1503 (03.82) (P04C09)



Europäisches
Patentamt

**UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE
ERGÄNZUNGSBLATT C**

Nummer der Anmeldung

EP 97 12 2273

Obwohl die Ansprüche 5, 7, 8 und 9 (alle, so weit es sich um ein in vivo Verfahren handelt) sich auf ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, beziehen (Artikel 52(4) EPÜ), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.